烙铁头蛇毒血小板聚集素诱导的人血小板活化作用

陈 宏　万海英　阮长耿
（苏州医学院血栓与止血研究室）

摘　要

烙铁头蛇毒血小板聚集素（TMVA）诱导人血小板聚集，同时伴有5羟色胺释放和血栓烷B_2（即血栓烷A_2的稳定代谢产物）的形成。ADP清除系统（CP/CPK）或阿斯匹林阻断环氧化酶的不能抑制TMVA诱导的血小板活化反应。TMVA在有纤维蛋白原存在时可以诱导凝血酶处理后脱颗粒的血小板发生聚集。这些结果提示TMVA诱导的血小板聚集不依赖于释放反应和血栓烷A_2的形成。阿的平、川芎嗪和抗人血小板单克隆抗体SZ-2同样能阻断TMVA和血小板活化因子（PAF）对人血小板活化作用，提示TMVA可能与PAF具有某种共同的活化途径促使血小板活化。

关键词　血小板活化　聚集素　烙铁头蛇毒

近年来从蝰科蝮亚科蛇毒中提纯并鉴定了的多种血小板活化成份(Vargaftig, 1982; 阮长耿等，1985）。有些成份具有丝氨酸蛋白酶活性，如thrombocytin (Kirby, 1979) 和Crotalocytin（Schmaier, 1980）；有些成份则无酶活性，例如从烙铁头和棕点竹叶青中提取的血小板聚集素（PAS-TM, Ouyang, 1980; PAS-TG, Ouyang, 1983）以及从南美响尾蛇恐怖亚种中提取的血小板活化因子（Vargaftig, 1982）。

我们对湖南产烙铁头蛇毒诱导的血小板聚集进行的研究表明该蛇毒的作用不依赖于TXA_2途径，不同于PAS-PM的作用（阮长耿等，1983）。后者依赖前列腺素合成，因此ASA完全抑制它的活性(Ouyang, 1979)。用DEAE-Sephadex A-50柱层析分离及凝胶过滤处理，从湖南产烙铁头蛇毒中提纯了TMVA。TMVA是糖蛋白，SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳表明其分子量为68,000。TMVA的碳水化合物含量少于PAS-TM，仅为7％（王婉瑜等，1986）。

本文曾在“Animal Venoms and Hemostasis”国际讨论会(1985年7月 San Diego)上交流。本研究应用的抗人血小板单克隆抗体由中国科学院科学基金会资助。

本文探讨了TMVA诱导血小板聚集的作用机制。

材 料 与 方 法

TMVA由昆明动物研究所提供。ADP、AA、磷酸肌酸(P)和磷酸肌酸激酶(CPK)均为Sigma产品。PAF和A_{23187}为Calbicchem产品，瑞斯托霉素为Lundbeck产品，凝血酶为天津生物制品厂产品，川芎嗪（北京制药工业研究所，1977）和阿的平由苏州医学院药理教研室提供，抗人血小板单克隆抗体AN51（Ruan，1981）和SZ-2(阮长耿等，1985）由本研究室制备。

血小板聚集按比浊法（阮长耿等，1983）用PAM-2型自动平衡血小板聚集仪（江苏省丹阳无线电厂产）。富血小板血浆（PRP）用人枸橼酸抗凝血液离心制备。在凝血酶刺激试验中，人血小板经洗涤除去血浆后悬浮在改良的含0.25%牛血清白蛋白的苔式液中(2.6m*M* KCl，1.05m*M* MgCl，137 m*M* NaCl，1.3m*M* CaCl，10m*M* Tris，5.05m*M*葡萄糖，pH7.4）。血小板数调整在300,000/μl。

脱颗粒血小板参照Teng等（1981）的方法制备。人血小板悬液37°C温育5分钟，加入凝血酶（终浓度0.3μ/ml）。EDTA（0.2m*M*）搅匀后继续温育6分钟，上述混合物在1000 *g* 离心10分钟，血小板沉淀洗涤两遍后用上述苔氏液悬浮。

电镜研究按照White (1968)方法。血小板加入等体积0.125%戊二醛在Eppendorf离心管中以15,000 g离心3分钟，样品逐级固定，常规法包埋，超薄切片后用醋酸铀和枸橼酸铅染色，在日立H-500电镜下观察。

5-HT释放测定，用^{3}H-5HT（^{3}H-5HT硫酸肌酸，10ci/m*M* 中科院上海原子能研究所）标记枸橼酸抗凝血小板37°C 30分钟，标记后的PRP加入不同诱导剂搅拌，聚集3分钟，加入冰冷的EDTA（0.1*M*）终止反应，在Eppendorf管中15,000 g离心3分钟，结果以血小板释放的^{3}H-5HT百分数表示。部分试验采用未标记的血小板。5-HT释放用荧光光度法测定，5-HT与OPD缩合生成荧光产物（万海英，1985）。

TXB_2按Fitzpatrick（1982）放射免疫法测定，示踪剂采用^{125}I标记的TXB_2。抗血清由Maclouf博士赠给（法国血栓与止血中心，巴黎）。

结 果 与 讨 论

（一）TMVA诱导的人血小板活化反应　TMVA诱导人血小板聚集所需的最低浓度为0.2μg/ml，约是粗毒的二十分之一，血小板聚集率随TMVA浓度增高而增强（图1）。TMVA同时诱导人血小板中5-HT的释放（表1）。

（二）TMVA诱导的血小板聚集不依赖释放反应　在EDTA（0.2m*M*）存在下，凝血酶（0.3μ/ml）能诱导人血小板的释放反应，但不引起聚集，在此条件下凝血酶诱导的5-HT释放可达98%，电镜观察大部分致密体和α-颗粒已经消失（图2）。TMVA在高浓度（30μg/ml）及纤维蛋白原（0.3%）存在下可以诱导凝血酶脱颗粒的血小板产生聚集，而ADP、凝血酶本身以及TMVA在没有纤维蛋白原存在时均不能引起聚集（图

3）。用PAS-TM（Teng, 1981）和PAS-TG（Ouyang, 1979）一样，TMVA诱导的血小板聚集也不依赖于释放反应。

（三）TMVA诱导的血小板聚集不依赖于TXA_2的生成　TMVA不仅诱导血小板聚集，而且诱导TXB_2（TXA_2的稳定代谢产物）的生成。TMVA对TXB_2生成的作用与PAF相同但弱于AA（图4a）。当TXB_2的生成被ASA（10m*M*）完全阻断后AA（100μg/ml）诱导的血小板聚集完全消失，但ASA不能完全阻断由TMVA和PAF诱导

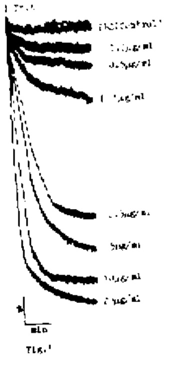


Fig. 1 TMVA induced platelet aggregation. The platelet aggregation expressed by light transmission. Serotonin measured fluometrically after condensation with O-phthaldialdehyde.

Table. 1 Effect of TMVA on Platelet Aggregation and 5-HT Release Reaction

TMVA (μg/ml)	% Aggregation	% Release
1	24± 7	—
5	41±12	23±16
10	63± 7	61±13
20	74± 8	72±10

These values represent means±S. D. (n = 6)



Fig. 2a Thin section of human platelets before the treatment of thrombin. Magnifying power, 15000

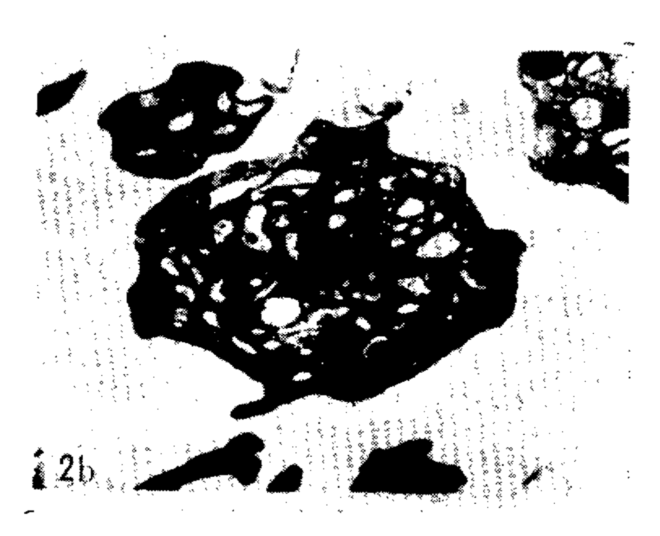


Fig. 2b Degranulated platelets from a sample exposed to 0.3u/ml of thrombin at 37℃ for 6 min in the presence of EDTA (0.2mM). Magnifying power, 12000

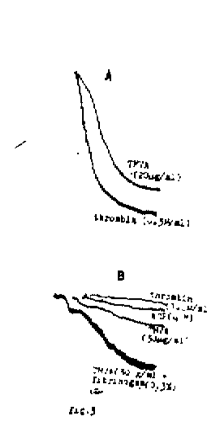


Fig. 3 Effect of TMVA on platelet aggregation of the thrombintreated (degranulated). A is control platelets, B is degranulated platelets.

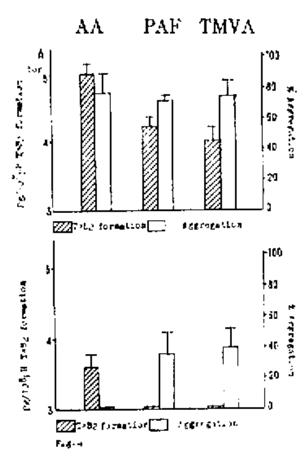


Fig. 4a Fffects of inducers on TXB_2 formation and platelet aggregation. AA(100 μg/ml), PAF 3 × 10^{-7}M), TMVA(10μg/ml).

Fig. 4b Effect of aspirin(100mM) on TXB_2 formation and platelet aggregation. AA (100μg/ml), PAF(3 × 10^{-7}M), TMVA(10μg/ml).

的聚集（图4b）。TMVA的这一活性不同于PAS-TM，后者的活性与前列腺素合成有关，可以被ASA（5 m*M*）完全阻断（Ouyang, 1979）。

血小板用ASA（10mM）和ADP清除系统CP/CPK（5 mM/10μ/ml）一起处理后也不能完全阻止TMVA（10μg/ml）和PAF（$3\times10^{-7}M$）诱导的聚集。因此TMVA对血小板的聚集作用不依赖于ADP（包括释放的ADP）和TX合成，与PAS-TG（Ouyang, 1983）和Convulxin（Vargaftig, 1982）相似。

（四）TMVA和PAF的共同途径　阿的平呈剂量依赖性(25—100μM)抑制TMVA（10μg/ml）诱导的血小板聚集和释放（表2）。

川芎嗪对TMVA诱导血小板聚集和释放反应的抑制也呈剂量依赖性（1.3—6 mM）见表3。阿的平和川芎嗪对PAF诱导的血小板聚集和释放的抑制有类似TMVA的情况，但A_{23187}对这些抑制剂均不敏感（表2，表3）。阿的平和川芎嗪也抑制TMVA诱导的TXB_2的生长。阿的平是磷脂酶A抑制剂。川芎嗪对人血小板的作用可能通过抑制磷脂酶C（本室未发表资料）。我们的实验尚不能阐明TMVA和PAF间的关系，但提示TMVA和PAF可能存有某些共同的途径。例如在血小板活化期间，通过不依赖于TXA_2的途径，激活磷脂酶A和/或磷脂酶C而产生Ca^{++}流（Nichols, 1981）。

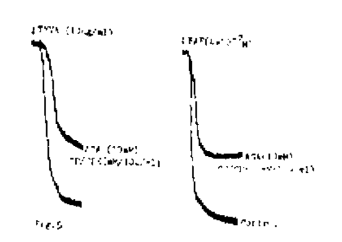


Fig. 5　Effects of aspirin, CP/CPKon platelet aggregation

Table. 2　Effect of Mepacrine on Platelet Aggregation and ^{3}H-5HT Release Reaction

Inducer (fin. concn.)	Mepacrine (μM)	% Aggregation	% Release
	0	64±8(3)	58±11(3)
TMVA(10μg/ml)	25	31±13(3)	15±2(3)
	50	18±5(3)	14±2(3)
	100	10±6(3)	11±6(3)
	0	57±2(3)	46; 33
PAF(1.82×10^{-7}M)	25	13; 28	12; 10
	50	10; 16	13; 13
	100	6; 8	11; 0
	0	67±13(3)	67±17(3)
A_{23187}(15μM)	25	53±14(3)	62±14(3)
	50	69±18(3)	67±10(3)
	100	56; 48	72; 77

The values represent means±S. D. (n).

Table. 3 Effect of Tetramethyl pyrazine (TP) on Platelet Aggregation and ^{3}H- 5HT Release Reaction

Inducer (fin. concn.)	TP(mM)	% Aggregation	% Release
	0	64± 8(3)	58±11(3)
TMVA (10μg/ml)	1.5	49±16(3)	40± 9(3)
	3	38± 6(3)	29±10(3)
	6	7± 3(3)	10± 3(3)
	0	62±14(3)	45±10(3)
PAF (1.82×10^{-7}M)	1.5	35±20(3)	18±11(3)
	3	26±10(3)	3; 0
	6	0	0
	0	61; 62	69±17(3)
A_{23187} (15μM)	1.5	63±14(3)	62±14(3)
	3	68; 57	64; 90
	6	49	92

The values represent means±S. D. (n).

(五) TMVA、PAF和胶原的共同作用部位 我们用两种抗人血小板膜糖蛋白Ib (GPIb) 的单克隆抗体，AN51及SZ-2研究了它们对TMVA诱导的血小板聚集的影响。AN51特异性抑制瑞斯托霉素诱导的血小板聚集 (Ruan, 1981)。SZ-2不仅抑制瑞斯托霉素而且抑制胶原诱导的血小板聚集 (Ruan, 1985) 提示SZ-2的抗原决定簇与血小板胶原受体亦有关。

TMVA (10μg/ml)、PAF ($3\times10^{-7}M$) 诱导的血小板聚集不受AN51的抑制，但SZ-2呈剂量依赖性 (5—10μg/ml) 抑制TMVA和PAF的聚集作用 (图6)。

Vargaftig等 (1983) 证明Cenvulxin和胶原之间存在特异的交叉失敏现象，提示它们在血小板膜上具有共同的作用部位。我们的结果表明，TMVA、PAF和胶原在血小板膜表面上可能享有共同作用部位，其中之一可能与被单克隆抗体SZ-2所识别的GPIb有关。

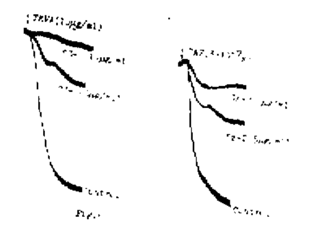


Fig. 6 Effect of monoclonal antibody SZ-2 on platelet aggregation induced by TMVA (10μg/ml) and PAF(3×10^{-7}M).

综上所述，TMVA呈剂量依赖性诱导人血小板聚集并伴有TXA_2生成和5-HT释放。然而TMVA诱导的血小板聚集并不依赖于释放反应和TXA_2生成。TMVA对人血小板作用不同于ADP、AA、凝血酶和A_{23187}，而类似于PAF，其作用依赖于磷脂酶A和/或磷脂酶C的活化。TMVA、PAF和胶原在血小板膜上可能享有共同的作用部位。

参考文献

王绕瑜等 1987 烙铁头蛇毒血小板聚集素的生化性质。本专辑

万海英等 1985 血小板的5HT荧光测定法。江苏医学 (12):24

阮长耿等 1983 烙铁头蛇毒对血小板的活化作用。动物学研究 (3):245

阮长耿等 1985 抗人血小板单克隆抗体的研究Ⅰ. 一组分泌抗人血小板单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞。中华血液学杂志 (6):130

北京制药工业研究所 1977 川芎嗪有效成分的研究Ⅰ. 川芎嗪的提取、分离和结构鉴定。中华医学杂志 57:420

Fitzpatrick, F. A. 1982 *Methods in Enzymology* 86:286

Kirby, E. P., Niewiarowski, S., Stocker, K., Kettner, C., Shaw, E. and Brudzynski, T. M. 1979 *Biochemistry* 18:3564

Maclouf, J., Pradel, M., Pradelles, P., Dray, F. 1976 *Biochem. Biophys. Acta* 431:139

Nichols, W. L., Gerrard, J. M. and Didisheim, P. 1981 In Poller, L. (ed) Recent Advances in Blood Coagulation, Churchill, Edinburgh. №. 3, pp. 1—39

Ouyang, C. and Teng, C. M. 1979 *Thrombos. Haemostas.* 41:475

Ouyang, C., Wang, J. P. and Teng, C. M. 1980 *Biochim. Biophys. Acta,* 630:246

Ouyang, C. and Huang T-F. 1983 *Biochim. Biophys. Acta* 761:126

Ruan, C., Tobelem, G., Mc, Michael. A. J., Drouet, L., Legrand, Y., Degos, L., Kieffer, N., Lee, H. and Caen, J. P. 1981 *Brit. J. Haematol,* 49:511

Ruan, C., Du, X., Xi, X., Castaldi, P. A. and Berndt, M. C. 1985 *Thrombos. Haemostas.* 54:124

Schmaier, A. H., Claypool, W. and Colman, R. W. 1980 *Blood* 56:1013

Teng, C. T., Liao, K. K. Wang, J. P., Lin, H. S. and Ouyang, C. 1981 *Toxicon* 19:121

Vargaftig, B. B. 1982 *Toxicon* 20:279

Vargaftig, B. B., Joseph, D., Wal, F., Marlas, G., Chignard, M. and Chevance, L. G. 1983 *Eur. J. Pharmacol.* 92:57

White, J. G. 1968 *Blood* 31:604

THE ACTIVATION OF HUMAN PLATELETS INDUCED BY THE AGGREGOSERPENTIN OF *TRIMERESURUS MUCROSQUAMATUS* VENOM (TMVA)

Chen Hong Wan Haiying Ruan Changgeng

(Thrombosis and Haemostasis Research Unit, Suzhou Medical College, Suzhou)

Aggregation of human platelets induced by TMVA, a glycoprotein extracted from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*, was accompanied by the secretion of serotonin and the formation of thromboxane B_2 (TXB_2), a stable metabolite of TXA_2. The ADP scavenger creatine phosphate/creatine phosphokinase (CP/CPK), or inactivation of cyclooxygenase with aspirin failed to inhibit TMVA-induced activation. Thrombin-treated, degranulated platelets was aggregated in response to TMVA in the presence of fibrinogen. Thus the platelet aggregation induced by TMVA was independent on the release reaction and the formation of TXA_2. However, the TMVA-induced platelet activation was prevented by Mepacrine, Tetramethyl Pyrazine, a compund isolated from Chinese herbs, and SZ-2, a monoclonal antibody to human platelet membrane glycoprotein Ib. The actions of TMVA on human platelets were similar with that of PAF, suggesting that TMVA and PAF may share some common pathways of platelet activation.

Key Words Platelet activation Aggregoserpentin *Trimeresurus mucrosquamtus* venom